

На правах рукописи

Хасанова Резеда Рахматулловна

**РОЛЬ ГЕНОТИПА ИНФИЦИРУЮЩЕГО ШТАММА
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ**

14.00.16 – патологическая физиология
03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Уразова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук

Воронкова Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Хлусов Игорь Альбертович

кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

Фомина Татьяна Ивановна

Ведущая организация: Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи

Защита состоится «___» _____ 2009 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (634050, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «___» _____ 2009 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Туберкулез занимает одну из ведущих позиций среди наиболее распространенных инфекционных заболеваний. В России ухудшение эпидемической ситуации по туберкулезу с увеличением доли тяжелых распространенных форм болезни в структуре общей заболеваемости туберкулезной инфекцией началось с середины 80-х годов прошлого века и продолжается по сей день [Тунгусова О.С. и соавт., 2001; Duan L. et al., 2002; Samten B. et al., 2003; Баранов А. А., Марьяндышев А.О., 2008; Исакова Ж.Т. и соавт., 2008].

На сегодняшний день абсолютно доказанным является тот факт, что снижение эффективности иммунного надзора организма является одним из ключевых факторов предрасположенности к развитию туберкулезной инфекции, а качественные изменения микобактериальной популяции (появление высоковирулентных лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя) приводят к утяжелению течения специфического процесса в легких и существенно осложняют лечение [Мишин В.Ю. и соавт., 2002; Аксёнова В.А. и соавт., 2009; Morris S.C. et al., 2009].

Согласно современным представлениям, ключевую роль в формировании иммунитета к туберкулезной инфекции играют альвеолярные макрофаги и различные субпопуляции Т-клеток [Botha T. et al., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2008; Gallegos A.M. et al., 2008]. Исход взаимодействия макрофагов и микобактерий зависит от баланса антимикробной активности фагоцитирующих клеток и резистентности микобактерий к бактерицидному действию макрофагов [Хонина Н.А. и соавт., 2000; Urdahl K.V. et al., 2003]. При этом особо важная роль отводится Т-лимфоцитам, среди которых $CD4^+$ клетки активируют фагоцитарную и бактерицидную функции макрофагов, а $CD8^+$ лимфоциты способны оказывать прямое цитотоксическое действие на клетки, инфицированные *Mycobacterium tuberculosis* [Черных Е.Р. и соавт., 2002]. Кроме того, Т-клетки играют существенную роль в запуске и регуляции специфического гуморального иммунитета при туберкулезе, протективная роль которого в защите от инфекции изучена мало [Harmala L.E. et al., 2002; Hickman S.P. et al., 2002].

Проблема распространения штаммов *M. tuberculosis*, резистентных и полирезистентных к специфическим химиопрепаратам, имеет в настоящее время огромное значение как для России, так и для всего мира. По данным ВОЗ, около 50 млн. людей на Земле инфицированы мультирезистентными штаммами микобактерий туберкулеза [Марьяндышев А.О. и соавт., 2007].

Выявление источников инфекции служит основой ограничения распространения микобактерий туберкулеза. Изучение эпидемиологии туберкулеза до последнего времени было затруднено и весьма несовершенно из-за отсутствия достоверных методов маркирования штаммов микобактерий в целях изучения гетерогенности популяции, определения ареалов распространения возбудителя, расшифровки путей передачи, миграции и механизмов формирования циркулирующих в определенном регионе полирезистентных штаммов.

На протяжении последних лет в микобактериологии широко используются молекулярные технологии генотипирования и дифференцирования *M. tuberculosis* на уровне хромосомной ДНК [Filliol I. et al., 2002; Тунгусова О.С. и соавт., 2003; Abebe F., Vjune G., 2006; Марьяндышев А.О. и соавт., 2007; Djelouadji Z. et al., 2008]. Созда-

ние библиотек генов микобактерий, а также накопление информации по нуклеиновым кислотам, видовой специфичности белков возбудителей туберкулеза, открытие вставочных элементов в геномном материале *M. tuberculosis* предоставляют возможность для внутривидовой дифференциации штаммов микобактерий и изучения их полиморфизма [Скотникова И.О., 2005; Abebe F., Bjune G., 2006; Mahapatra S. et al., 2008].

Известно, что генетическая структура и физико-химические особенности микробного штамма *M. tuberculosis* формируют основу их вирулентности (патогенности) – основного видового признака [Kremer K. et al., 1999]. В литературе имеются данные о том, что характер специфического воспаления (фазы развития, выраженность изменений, клеточный состав очага и т.д.) во многом зависит от биологических свойств поражающего штамма *M. tuberculosis*. Так, например, известно, что туберкулез легких, вызванный лекарственно-резистентными микобактериями имеет ряд особенностей тканевых и клеточных реакций по сравнению с чувствительным к химиотерапии вариантом болезни [Зюзя Ю.Р. и соавт., 2004; Sharma S. et al., 2004; Ковальчук Л.В., 2008; Фрейдлин И.С., 2008]. Клинически лекарственно-устойчивый туберкулез легких протекает намного тяжелее, а неблагоприятные исходы заболевания встречаются чаще, чем при лекарственно-чувствительном варианте. Кроме того, высказывается предположение, что появление и размножение в процессе терапии лекарственно-устойчивых микобактерий туберкулеза служит доказательством ослабления иммунологической резистентности организма, способствующего размножению высоковирулентных инфектогенов [Rad M.E. et al., 2003; Quesniaux V. et al., 2004; Перельман М.И., 2007; Байрамов А.Л. и соавт., 2008].

В свете изложенного, представляется важным изучение роли биологических свойств инфекционного агента (таких как лекарственная устойчивость и генетический профиль) в определении характера иммунологического дисбаланса, сопровождающего туберкулезную инфекцию, что в свою очередь поможет облегчить диагностику и прогнозирование исходов заболевания, выявление групп риска по развитию прогрессирующих форм болезни, позволит проводить адекватную химиотерапию и иммунокоррекцию.

Цель исследования. Установить роль генотипических особенностей инфицирующего штамма *Mycobacterium tuberculosis* (лекарственная чувствительность, VNTR-профиль) в модуляции иммунопатологических изменений при туберкулезе лёгких.

Задачи исследования.

1. Оценить генетическую гетерогенность клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* (лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых), циркулирующих на территории Томской области.
2. Охарактеризовать особенности и патогенетические факторы нарушений клеточного звена иммунитета у больных с инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких, выделяющих микобактерии, чувствительные и с различным спектром устойчивости (моно-, поли- и мультирезистентные) к противотуберкулезным препаратам.
3. Оценить характер нарушений реактивности лимфоцитов периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом

легких в зависимости от варианта VNTR-профиля инфицирующего штамма *Mycobacterium tuberculosis*.

Научная новизна. Впервые при помощи генетического типирования клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* установлена циркуляция штаммов семейства Beijing на территории г. Томска и Томской области. Показано, что *M. tuberculosis* пекинского семейства имеют высокую степень генетического родства и более высокий уровень множественной лекарственной устойчивости, чем «непекинские» штаммы возбудителя. Впервые проведено комплексное изучение CD-субпопуляционного состава и функциональных свойств лимфоцитов периферической крови при различных формах туберкулеза легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости и генотипического профиля инфицирующего штамма *M. tuberculosis*. Установлено, что течение туберкулеза легких с лекарственной мультирезистентностью характеризуется более выраженным угнетением пролиферативной и резервной IL-2-продуцирующей активности лимфоцитарных клеток, чем при туберкулезе легких с лекарственной полирезистентностью и монорезистентном варианте, при котором определяется высокий уровень базальной и БЦЖ-индуцированной продукции IL-12. Продемонстрировано, что *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing вызывают реже диссеминированный и чаще инфильтративный (уникальные штаммы – лекарственно-чувствительный, кластеризующиеся – лекарственно-резистентный) туберкулез лёгких, для которого характерны выраженный лейкоцитоз, угнетение пролиферативной активности лимфоцитов крови и базальной продукции IL-2, и напротив, высокий уровень секреции IL-12. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что изменения субпопуляционного состава лимфоцитов крови (снижение количества CD3⁺, CD4⁺, повышение абсолютного числа CD16⁺ клеток) более значительны при туберкулезе лёгких, индуцированном некластеризующимися Beijing-штаммами *M. tuberculosis* (с уникальным VNTR-профилем), тогда как для заболевания, вызванного кластеробразующими Beijing-штаммами *M. tuberculosis* (со 100%-й степенью гомологии VNTR-профилей) свойственно увеличение выработки IL-12.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные расширяют существующие фундаментальные знания об иммунопатогенезе туберкулезной инфекции, механизмах формирования функциональных нарушений и популяционного состава лимфоцитов периферической крови у больных с инфильтративной и диссеминированной формами туберкулеза легких в зависимости от биологических свойств инфицирующего штамма *Mycobacterium tuberculosis*. Результаты исследования могут быть использованы для разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения туберкулеза легких, а также способов профилактики и коррекции иммунопатологических осложнений специфического процесса. Принадлежность *M. tuberculosis* к генетическому семейству Beijing, подтвержденная результатами генетического типирования 77 клинических изолятов, свидетельствует о необходимости детального анализа трансмиссии и эпидемиологической значимости данных штаммов на территории Томской области с целью усовершенствования профилактических мероприятий по предотвращению распространения остро прогрессирующих деструктивных форм заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. На территории г. Томска и Томской области циркулирует популяция генетически неоднородных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, среди которых 19% проявляют множественную лекарственную устойчивость. Штаммы семейства Beijing в популяции составляют 27%, имеют высокую степень генетического родства (82%); уровень их множественной лекарственной устойчивости в 3 раза выше, чем у «непекинских» штаммов.
2. Характер нарушений функциональной активности лимфоцитов крови при лекарственно-резистентном туберкулезе легких зависит от спектра лекарственной устойчивости инфицирующего штамма *Mycobacterium tuberculosis*; монорезистентный вариант туберкулезной инфекции отличается высоким уровнем базальной и БЦЖ-индуцированной секреции IL-12 и (как и полирезистентный) менее выраженным снижением пролиферативной и резерва IL-2-продуцирующей активности лимфоцитов, чем при туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью.
3. *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства Beijing в подавляющем большинстве случаев вызывают инфильтративный лекарственно-чувствительный (уникальные штаммы) и лекарственно-устойчивый (кластеризующиеся штаммы) туберкулез лёгких с выраженным лейкоцитозом, низким уровнем лимфопролиферации на фоне гипопродукции IL-2 и гиперпродукции IL-12. При этом T/NK-клеточный дисбаланс и продукция IFN γ у больных, инфицированных Beijing-штаммами с уникальным VNTR-профилем, более значительны, чем при туберкулезе лёгких, вызванном Beijing-штаммами с абсолютной гомологией VNTR-профилей.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на VIII Российском съезде фтизиатров «Туберкулез в России год 2007» (Москва, 2007), на международной Российско-Японской конференции «К 15-летию Российско-Японского медицинского сотрудничества под эгидой Японско-Российского Фонда Медицинского Обмена (1992-2007 гг.)» (Благовещенск, 2007), межгородской конференции молодых учёных «Актуальные вопросы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2007), VIII конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007, 2008), II Российско-германской конференции Форума Коха-Мечникова «Туберкулез, СПИД, вирусные гепатиты, проблемы безопасности крови и менеджмент в здравоохранении» (Томск, 2007), научных семинарах кафедр патологической физиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава» (Томск, 2006-2009).

Работа выполнена на базе кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии, Центральной научно-исследовательской лаборатории и Межкафедральной лаборатории молекулярной медицины ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава г. Томска при финансовой поддержке Совета по грантам при Президенте РФ для ведущих научных школ РФ (НШ-2334.2008.7 «Роль генетически детерминированных реакций системы крови в патоморфозе инфекционных заболеваний») и Федерального агентства по науке и инновациям РФ в рамках направления «Живые системы» ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (государственные контракты №02.412.11.2040 «Молекулярные основы персонализированной терапии социально-

значимых инфекционных заболеваний и прогнозирование исхода взаимодействия инфектогена и иммунной системы макроорганизма», №02.512.11.2112 «Молекулярно-генетические основы управления адаптационной реактивностью системы крови человека при инфекциях», №02.512.12.0013 «Разработка технологических основ персонализированной терапии и профилактики социально-значимых бактериальных и вирусных заболеваний на основе идентификации молекулярно-генетических механизмов нарушений иммунореактивности системы крови»).

Результаты исследований используются в лекционном курсе по патологической физиологии в разделе «Патофизиология клетки», «Патофизиология иммунитета», «Патофизиология системы крови», «Воспаление».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 работ, из них 6 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 3 рисунками и 34 таблицами. Библиографический указатель включает 260 источников, из них 168 отечественных и 92 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты обследования 124 пациентов (89 мужчин и 35 женщин) в возрасте 18-55 лет, страдающих распространённым деструктивным инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулёзом лёгких (ТЛ), проходивших лечение во фтизиатрическом отделении №1 (зав. отд. – Новосельцева О.И.) Томской областной клинической туберкулезной больницы (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова). Диагноз ТЛ устанавливался на основании клинической картины заболевания, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты, рентгенологического исследования лёгких. В исследование не включались больные с другими клиническими формами туберкулезной инфекции, с тяжелыми сопутствующими заболеваниями инфекционного и неинфекционного генеза, а также лица, получающие терапию глюкокортикоидами и иммуномодулирующими препаратами. Распределение больных ТЛ по группам представлено в табл. 1.

Группу сравнения составили 35 здоровых доноров в возрасте от 18 до 55 лет мужского и женского пола.

Таблица 1

Распределение больных туберкулёзом легких по группам

Группы обследованных лиц		Абсолютное число	%
Больные с лекарственно-чувствительным туберкулёзом лёгких	Инфильтративным	60	49,7
	Диссеминированным	14	11,6
Больные с лекарственно-устойчивым туберкулёзом лёгких	Инфильтративным	37	29,8
	Диссеминированным	13	8,9

Материалом для иммунологического исследования являлась периферическая кровь, стабилизированная гепарином (25 ЕД/мл), забор которой производили утром натощак из локтевой вены.

Методы исследования. Определение общего количества лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в периферической крови проводили с использованием общепринятых гематологических методов. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови на градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³) [Меньшиков В.В., 1987]. Концентрацию жизнеспособных клеток определяли в счётной камере Горяева с использованием 0,5% раствора трипанового синего [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992]. Определение дифференцировочных антигенов лимфоцитов (CD-маркеров) человека проводили лимфоцитотоксическим методом с использованием наборов моноклональных антител (ООО «Сорбент», г. Подольск, Московская обл.) к маркерам: CD3⁺ (общий маркер Т-лимфоцитов), CD4⁺ (маркер Т-хелперов), CD8⁺ (маркер цитотоксических/супрессорных Т-лимфоцитов), CD16⁺ (маркер натуральных киллеров), CD45RA⁺ (маркер наивных Т- и В-лимфоцитов). Пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови оценивали МТТ-методом, основанным на изменении цвета связывающегося с клетками красителя 3-[4,5,-диметилтиазол-2ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ, тиазолил синий) из синего в желтый [Carmichael J., 1987]. Для определения уровней IL-2, IL-4, IL-12 и IFN γ в супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA). Для стимуляции секреторных способностей лимфоцитов в пробы вносили комплексный белковый и липидный антигены, выделенные из *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing¹, в дозе 20 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно, рекомбинантный IL-2 («Biosource», USA) в дозе 5 нг/мл и вакцинный штамм БЦЖ в дозе 50 мкг/мл.

Параллельно с исследованием параметров иммунного статуса у больных с различными формами ТЛ проводили изучение генетического полиморфизма 77 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных из мокроты соответствующего количества пациентов до назначения им специфической противотуберкулезной химиотерапии. Для видовой идентификации *M. tuberculosis* и определения их чувствительности к противотуберкулезным химиопрепаратам (методом абсолютных концентраций) производился посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2. Сбор и подготовку образцов биомассы *M. tuberculosis* осуществляли в бактериологической лаборатории Томского областного противотуберкулезного диспансера (зав. лабораторий – В.Е. Павлова). Типирование *M. tuberculosis* проводили в лаборатории разработки новых методов диагностики заболеваний человека отдела иммунотерапевтических препаратов ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (пос. Кольцово, Новосибирская обл., зав. – д-р биол. наук С.И. Татьков). Типирование клинических изолятов *M. tuberculosis* осуществляли методом MIRU-VNTR, используя 12 пар праймеров для амплификации локусов микобактериального генома: MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40 [Cowan L.S. et al., 2002].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки нормаль-

¹ Антигены предоставлены иммунологической лабораторией Института инфекционной биологии им. Макса Планка (г. Берлин, Германия)

ности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах вычисляли медиану, 25%-й и 75%-й квартили. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили путём вычисления r -коэффициента Спирмена. Для оценки частоты встречаемости качественных признаков использовали критерий Хи-квадрат Пирсона.

Построение дендрограммы кластеризации *M. tuberculosis* проводили путем оцифровки длин полученных ампликонов (электрофореграмм); общую дендрограмму рассчитывали с применением категориального коэффициента подобия методом UPGMA-невзвешенного попарного арифметического среднего по программе BioNumerics («Applied Math», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время ведущими факторами прогрессирования туберкулёзной инфекции принято считать постепенно нарастающий в популяции иммунодефицит, а также изменения биологических свойств возбудителя – возможность персистирования в фагоцитах (повышение выживаемости в них), появление лекарственной устойчивости [Хоменко А.Г., 1999; Краснов В.А. и соавт., 2008]. Состояние факторов иммунологической защиты является решающим при инфицировании, определяет остроту течения и исход заболевания при развитии туберкулёзной инфекции. В элиминации внутриклеточных микробов, типичными представителями которых являются *M. tuberculosis* (МБТ), главная роль принадлежит триаде: Т-лимфоцитам, НК-клеткам и макрофагам, способным синтезировать $IFN\gamma$, $IL-1$, $IL-2$, $TNF\alpha$, резко усиливающие их функциональные свойства. При этом вероятность развития ТЛ определяется состоянием клеточного иммунитета, значительно повышается на фоне иммунодепрессии и тесно связана со степенью ее выраженности: качественной (функциональной) и количественной недостаточностью Т-лимфоцитов [Новицкий В.В. и соавт., 2005; 2006; 2008].

Для оценки состояния клеточного звена иммунитета у больных ТЛ определялось число отдельных субпопуляций лимфоцитарных клеток и их функциональная (пролиферативная и цитокинпродуцирующая) активность.

Как показали результаты проведенного исследования, у больных с ТЛ в острую фазу заболевания независимо от клинической формы, а также от чувствительности к химиопрепаратам инфицирующего штамма *M. tuberculosis* отмечалась относительная лимфоцитопения на фоне увеличения общего количества лейкоцитов по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров. Наиболее выраженные изменения были зарегистрированы у больных с диссеминированным лекарственно-чувствительным (ЛЧ) и лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТЛ. При изучении CD-популяционного состава лимфоцитов периферической крови у больных ТЛ было выявлено снижение как относительного, так и абсолютного числа CD3-, CD4- и CD45RA-позитивных лимфоцитов и, напротив, увеличение количества CD8⁺ и CD16⁺ клеток во всех обследуемых группах независимо от варианта туберкулёзной инфекции и клинической формы заболевания. При этом у больных с диссеминированным

ЛУТЛ были зарегистрированы более низкие значения абсолютного содержания CD3⁺-, CD8⁺-, CD16⁺- и CD45⁺-лимфоцитарных клеток относительно аналогичных параметров у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ и инфильтративным ЛУТЛ.

Как известно, во взрослом организме постоянство числа клеток в лимфоидных популяциях обеспечивается балансом между их образованием (за счёт лимфоцитопоза и пролиферации) и гибелью (как правило, по пути апоптоза). Исследованиями группы учёных Центрального НИИ туберкулёза РАМН г. Москвы установлено, что при выраженной инфильтрации в легочной ткани происходит истощение ферментных систем в лимфоцитах периферической крови, что приводит к дезинтеграции процессов дыхания и гликолиза, снижению пролиферативной активности и нарушениям количественных соотношений CD-субпопуляций лимфоидных клеток, характерных для вторичного иммунодефицита [Мишин В.Ю. и соавт., 1992, 1995; Черных Е.Р. соавт., 2002; Сахно Л.В. и соавт., 2004; Garrity D. et al., 2005]. Вероятно, эти же механизмы могут обуславливать нарушения фракционного состава лимфоцитов крови, установленные в настоящей работе.

Известно, что по уровню бласттрансформации можно судить о функциональном состоянии иммуноцитов, которое напрямую определяет способность организма к оптимальной реализации специфического иммунного ответа. В работе для оценки общей реактивности лимфоцитов мы ставили перед собой задачу охарактеризовать уровень пролиферативной активности клеток *in vivo* (активность спонтанной бласттрансформации), а также резерв пролиферации лимфоцитов в ответ на индукторы, в качестве которых использовали белковый и липидный антигены *M. tuberculosis* Beijing-семейства, вакцинный штамм *M. bovis* (БЦЖ) и рекомбинантный IL-2.

Анализ пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови у больных ТЛ позволил выявить снижение уровня спонтанной бласттрансформации клеток относительно контрольных значений вне зависимости от клинической формы и варианта туберкулёзной инфекции. Применительно к ТЛ нельзя не отметить тот факт, что снижение пролиферативного ответа может быть обусловлено перераспределением антигенреактивных клеток в поражённую специфическим процессом ткань лёгкого [Слабнов Ю.В. и соавт., 2000]. Необходимо также учитывать, что процесс бласттрансформации сопряжен с синтезом белка. Между тем, вследствие прямого и опосредованного повреждающего действия токсичных компонентов МБТ (например, корд-фактора, комплекса сульфатидов, фенольных гликолипидов (ФГЛ) и др.) на лимфоциты нарушается экспрессия мембранных рецепторов и синтез лимфокинов, что приводит к угнетению чувствительности клеток к активирующим сигналам и процессов биосинтеза белка [Новицкий В.В. и соавт., 2005, 2006, 2008; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Перельман М.И., 2007]. Очевидно, что угнетение бластобразования служит одной из ведущих причин снижения содержания в периферической крови отдельных субпопуляций лимфоидных клеток при ТЛ.

Анализ пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови у больных ТЛ позволил установить, что стимуляция лимфоцитов *in vitro* добавлением в культуральную суспензию клеток белкового и липидного микобактериальных антигенов, рекомбинантного IL-2 и вакцины БЦЖ приводила к повышению показателей бластообразования у здоровых доноров и больных ТЛ относительно уровня базальной

пролиферации. Однако в целом у больных инфильтративным и диссеминированным ЛЧТЛ и ЛУТЛ регистрировался более низкий уровень стимулированной лимфопротиферации относительно соответствующих значений в контроле. При этом при диссеминированном ЛЧТЛ уровень белок-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови оказался выше, а уровень липид-индуцированной лимфопротиферации, напротив, ниже, чем при инфильтративном ЛЧТЛ. Кроме этого, диссеминированный ЛУТЛ сопровождался более низкими значениями белок- и ИЛ-2-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови, чем диссеминированный ЛЧТЛ.

Важнейшими индукторами роста Т-лимфоцитов, определяющими Т/В-клеточное равновесие, являются ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7. В первые часы после стимуляции антигеном Th1 секретируют ИЛ-2, взаимодействие которого с высокоафинными рецепторами к данному цитокину активирует Т-лимфоциты. К тому же ИЛ-2 является важнейшим медиатором клеточного иммунитета. Количественные изменения его продукции чреваты дизрегуляцией иммунного ответа, влекущей впоследствии тяжёлое течение и неблагоприятный исход заболевания. На различных этапах иммунного ответа спектр цитокинов изменяется в связи со сменой основных клеток-продуцентов, силы антигенного воздействия на них и со стадией патологического процесса [Carayannopoulos L.N., Yokoуama W.M., 2003].

Анализ цитокинсекретирующей способности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных ТЛ выявил угнетение уровня спонтанной продукции ИЛ-2 (по сравнению с параметрами у здоровых доноров) вне зависимости от клинической формы заболевания как при ЛЧТЛ, так и при ЛУТЛ. Наиболее низкие ее значения отмечались при лекарственно-устойчивом варианте туберкулёзной инфекции. Добавление в культуру клеток белкового антигена МБТ пекинского семейства и рекомбинантного ИЛ-2 приводило к снижению продукции эндогенного ИЛ-2 у всех обследованных больных по сравнению с контролем. Уровень ИЛ-2-продуцирующей активности клеток при использовании липидного микобактериального антигена у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ и ЛУТЛ был сопоставимым с нормой. Наряду с этим, индекс стимуляции продукции мононуклеарами ИЛ-2 для вакцинного штамма БЦЖ оказался значительно более высоким (по отношению к контролю) у всех обследованных больных.

Зарегистрированное в острый период ТЛ угнетение спонтанной секреции ИЛ-2, основными продуцентами которого являются активированные Т-лимфоциты-хелперы 1 типа [Вахидова Г.А. и соавт., 1991; Ешану В.С., 2004], возможно, связано со снижением числа данного типа клеток-продуцентов. Кроме того, учитывая, что цитокины обеспечивают ауто- и паракринную регуляцию функционального статуса иммунокомпетентных клеток, уменьшение продукции ИЛ-2 могло быть опосредовано недостаточной нагрузкой других провоспалительных и Т-активирующих цитокинов – ИЛ-1 и TNF α , уровень продукции которых при ТЛ, как правило, оказывается пониженным [Кноринг В.Е. и соавт., 1999; Воронкова О.В. и соавт., 2007]. Учитывая паракринный тип регуляции межклеточных взаимодействий, логично предположить, что дефицит ИЛ-2 приводит к нарушению выработки других цитокинов с синергичным типом действия, в частности IFN γ .

Однако необходимо заметить, что уровень базальной наработки IFN γ мононуклеарами периферической крови у больных ТЛ, напротив, значительно превышал таковой в контроле независимо от клинической формы и варианта туберкулёзной инфекции. Оказывается, как свидетельствуют данные литературы, способностью секретировать IFN γ кроме Th1-лимфоцитов (в случае их количественной и качественной несостоятельности) обладают НК-клетки [Бурместер, Г.-Р., 2007; Morris S.C. et al., 2009]. Поскольку у всех обследованных нами больных ТЛ было обнаружено повышение числа CD16⁺ лимфоцитов в крови, это соответствующим образом могло отразиться и на продукции IFN γ , уровень которой прямо коррелировал с содержанием CD16⁺ клеток ($r=0,66$; $p<0,05$).

Вместе с тем, стимуляция мононуклеаров периферической крови белковым антигеном *M. tuberculosis*, рекомбинантным IL-2 и вакциной БЦЖ не приводила к повышению продукции IFN γ у больных с инфильтративным ТЛ и, напротив, вызывала ее увеличение при диссеминированном ЛУТЛ и ЛЧТЛ по отношению к базальному уровню секреции цитокина. Расчет индекса стимуляции для белкового и липидного микобактериальных антигенов, рекомбинантного IL-2 показал, что у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ и ЛУТЛ резервная способность к секреции IFN γ клетками периферической крови оказалась значительно более низкой, чем в группе контроля. Обращал на себя внимание более выраженный (чем в контроле) IFN γ -секреторный ответ мононуклеаров крови у всех обследуемых больных ТЛ (особенно при диссеминированной клинической форме) при добавлении в культуральную среду вакцины БЦЖ. Таким образом, резервная способность вырабатывать IFN γ на действие БЦЖ у больных ТЛ оказалась повышенной, исключение составили пациенты с инфильтративным ЛЧТЛ и ЛУТЛ, у которых уровень БЦЖ-индуцированной продукции IFN γ не отличался от базального.

IFN γ , как показано, является одним из сильнейших специализированных индукторов макрофагальной активации, индуцируя экспрессию более 100 различных генов. Кроме того, IFN γ в совокупности с IL-12 обеспечивает дифференцировку Th0-клеток в направлении Th1-лимфоцитов, что и обуславливает развитие выраженного гранулематозного воспаления [Макарова О.В., Михайлова Л.П., 2008]. Макрофаги потенцируют дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в направлении Th1 и продукцию ими IFN γ с помощью индукторов: IL-12, IL-18 и др. В свою очередь IFN γ усиливает наработку макрофагального IL-12, являющегося основным активатором синтеза самого IFN γ клетками Th1 типа. Таким образом, замыкается круг позитивной паракриной регуляции между макрофагами и лимфоцитами. Поскольку у обследованных нами больных ТЛ высокий уровень спонтанной продукции IFN γ сочетался с повышенным содержанием в крови НК-клеток и низким уровнем базальной концентрации IL-12 в культуре мононуклеаров крови, можно думать, что при ТЛ имеет место дисрегуляция механизмов межклеточной кооперации между CD16⁺ лимфоцитами и макрофагами, что, вероятно, также может влиять на формирование Т-дефицита.

Известно, что IL-12 в ряде случаев выступает заместителем IL-2 как основного фактора лимфопролиферации [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001]. Вероятно, зафиксированное нами угнетение бластообразования у больных ТЛ могло быть обусловлено одновременно низкой продукцией ростовых факторов – IL-2 и IL-12 либо (с

другой точки зрения) гиперсекрецией макрофагами иммунодепрессивных цитокинов (в частности IL-10) [Тоосси Z. et al., 1995; Hirsch C.S. et al., 1996, 1999; Gong J.H. et al., 1996].

Общепризнано, что синергистом IL-10 является IL-4 – продукт Т-лимфоцитов, который, обладая противовоспалительными свойствами, выступает в качестве антагониста IFN γ при воздействии на макрофаги, Т-хелперы, В-лимфоциты [O'Garra A., Murphy K., 1994]. IL-4 ингибирует IFN γ -опосредованные эффекты макрофагов, угнетая транскрипцию соответствующих генов. Между тем, уровень спонтанной продукции IL-4 у всех обследованных больных ТЛ вне зависимости от клинической формы и варианта туберкулёзной инфекции был ниже, чем в контроле, а индекс стимуляции секреции IL-4 используемыми индукторами у большинства больных ТЛ – наоборот, выше нормы. Таким образом, при ТЛ можно констатировать наличие не только Т-дефицита, но и относительную инертность Th2-клеток с сохранением резерва их функциональной активности. Известно, что альтернативные субпопуляции Th в противоинфекционной защите выполняют разные функции: Th1 – главные активаторы клеточного иммунного ответа, Th2 – индукторы В-лимфоцитов, а следовательно гуморального иммунного ответа. Преобладание активности гуморальных механизмов, которое предположительно связывают с нарушением иммунорегуляторной активности хелперных клонов лимфоцитов 1 и 2 типа, является одним из прогностически неблагоприятных факторов иммунопатогенеза туберкулеза [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2004; Garrity D. et al., 2005].

Проблема распространения штаммов *M. tuberculosis*, резистентных к специфическим химиопрепаратам, имеет в настоящее время огромное значение как для России, так и для всего мира. Немногочисленными экспериментальными исследованиями установлено, что характер специфического воспаления и иммунологическая реактивность организма во многом зависят от биологических свойств поражающего штамма *M. tuberculosis* [Васильева Г.И. и соавт., 2000; Сахно А.В. и соавт., 2004, 2006; Ковальчук Л.В., 2008; Фрейдлин И.С., 2008].

Для оценки изменений параметров иммунного статуса при ЛУТЛ в зависимости от спектра лекарственной резистентности инфицирующего штамма *M. tuberculosis* мы провели сравнение показателей у больных, выделяющих МБТ с моно-, поли- и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Анализ параметров количественного состава белой крови не выявил статистически значимых различий ОКЛ и субпопуляционного состава лимфоцитов у больных ЛУТЛ в зависимости от спектра лекарственной резистентности инфицирующего штамма *M. tuberculosis* – изменения носили однонаправленный характер. Проллиферативная активность лимфоцитов периферической крови на базальном уровне у больных ТЛ, инфицированных МЛУ-штаммами *M. tuberculosis*, оказалась сниженной по отношению к норме, тогда как у пациентов, инфицированных моно- и полирезистентными МБТ, данный показатель не отличался от контрольного. Уровень БЦЖ-индуцированного бластообразования *in vitro* у данной группы пациентов, напротив, значимо превышал соответствующие значения в группе контроля и у больных, выделяющих моно- и полирезистентные *M. tuberculosis*.

Известно, что при ЛУТЛ возникает дисбаланс количественных параметров иммунного статуса, более выраженный, чем при ЛЧТЛ. Это обусловлено своеобразным иммунологическим торможением, сопряжённым с возникновением сбоя в работе иммунной системы на фоне избыточного накопления антигена [Новицкий В.В. и соавт., 2005, 2006; 2008; Воронкова О.В. и соавт., 2007]. Исследованиями некоторых авторов установлено, что у больных ТЛ, инфицированных микобактериями с высокой жизнеспособностью и нарастающим спектром лекарственной устойчивости, регистрируются более низкие показатели пролиферации лимфоцитов в ответ на туберкулин (PPD) и фитогемагглютинин (ФГА), индуцированной ФГА продукции IL-2, относительного содержания лактоферрина и активности миелопероксидазы в сыворотке крови по сравнению с соответствующими параметрами у больных, выделяющих *M. tuberculosis* с низкой жизнеспособностью. На наш взгляд, это свидетельствует о более выраженном токсическом действии *M. tuberculosis* с МЛУ на клетки организма, в том числе и иммуноциты, в отличие от возбудителя с широким спектром лекарственной чувствительности. В данном случае мы судим об анергии Т-клеток *in vivo*, индуцированной возбудителем с определенными биологическими свойствами. Косвенным доказательством этому может служить значительно более высокий резерв пролиферативной активности лимфоцитов крови при МЛУ ТЛ.

Анализ цитокинпродуцирующей активности мононуклеаров периферической крови при ТЛ с разным спектром лекарственной устойчивости выявил снижение спонтанной секреции IL-2, IL-4, и, напротив, увеличение (более значимое при полирезистентном варианте ТЛ) продукции IFN γ относительно контроля. Обращал на себя внимание высокий уровень продукции IL-12 (базальной и БЦЖ-индуцированной) в культуре мононуклеаров крови больных с монорезистентным ТЛ, который значимо превышал аналогичные значения в группе контроля и у больных с поли- и МЛУ ТЛ. Помимо этого обнаруживался резко пониженный резерв IL-2-продуцирующей способности мононуклеаров крови у больных с МЛУ туберкулёзом (при стимуляции клеток белковым и липидным антигенами, выделенными из МБТ семейства Beijing), что на фоне низкой базальной продукции цитокина может свидетельствовать об истощении функциональной активности Th1-лимфоцитов, возможно вследствие длительного их контакта с аналогичным антигеном в организме больного. Вместе с тем, индекс стимуляции продукции IL-4 *in vitro* для всех используемых индукторов был повышенным, что на фоне низкой базальной секреции цитокина подтверждает ранее сформулированное предположение о супрессии Th2-лимфоцитов *in vivo* в условиях гиперсекреции IFN γ .

В основе MIRU-VNTR-типирования лежит амплификация локусов, содержащих рассеянные по геному повторяющиеся микобактериальные элементы. Исходя из того факта, что каждый из этих локусов в различающихся штаммах *M. tuberculosis* представлен различным числом копий повторов, родственные штаммы могут быть объединены в кластеры [Kremer K., 1999; Норкина О.В. и соавт., 2003]. Помимо неуклонного роста показателей впервые выявленного лекарственно-устойчивого варианта ТЛ, регистрируется учащение случаев инфицированности штаммами, относящимися к семейству Beijing, и приобретения вторичной антибиотикорезистентности, связанной с генетическими свойствами инфектогена, позволяющими ему быстро

адаптироваться к среде организма-хозяина и неблагоприятным воздействиям [Сурикова О.В. и соавт., 2005; Балабанова Я.М. и соавт., 2006].

Анализ дендрограммы кластеризации позволил нам заключить, что на территории г. Томска и Томской области циркулирует популяция генетически неоднородных штаммов *M. tuberculosis*, среди которых 19% проявляют множественную лекарственную устойчивость (рис. 1). Приблизительно 1/3 от всей популяции составляют штаммы семейства Beijing, которые в большинстве случаев вызывают инфильтративный, нежели диссеминированный туберкулез легких ($p < 0,005$ по критерию Хи-квадрат). По свидетельству многих авторов, *M. tuberculosis* пекинского семейства чаще всего характеризуются множественной лекарственной устойчивостью. Проведенное нами сопоставление данных определения спектра лекарственной устойчивости и генотипического профиля выявили, что из 21 клинического изолята МБТ с VNTR-профилем, характерным для Beijing-семейства, только 12 оказались лекарственно-резистентными, а остальные 9 изолятов оказались чувствительными к ПТП первого ряда. Нами было установлено, что лекарственно-резистентные штаммы *M. tuberculosis* чаще встречаются среди клинических изолятов, принадлежащих к семейству Beijing. Так, в клинических образцах среди 77 изолятов (вся выборка) изоляты с МЛУ достоверно чаще ($p < 0,005$ по критерию Хи-квадрат) встречались среди МБТ семейства Beijing, чем в среднем по выборке (рис. 1).

Для анализа зависимости изменений иммунного статуса у больных ТЛ от варианта генотипа инфицирующего штамма *M. tuberculosis* по результатам генотипирования возбудителя были сформированы группы обследованных лиц: в первую вошли больные, выделяющие МБТ, по генотипическим свойствам относящиеся к пекинскому семейству, вторую составили пациенты, инфицированные *M. tuberculosis* «не-Beijing»-семейства.

У больных, инфицированных МБТ, относящимися к семейству Beijing, был выявлен лейкоцитоз, который характеризовался более высокими цифрами, чем у пациентов, выделяющих «неBeijing»-штаммы МБТ. Спонтанная пролиферативная активность лимфоцитарных клеток периферической крови у данной группы больных также оказалась достоверно более высокой, чем у больных «неBeijing-туберкулезом». Однако добавление в культуральные суспензии микобактериальных антигенов приводило к угнетению (относительно спонтанного) уровня бласттрансформации лимфоцитов у больных, выделяющих МБТ пекинского семейства; индексы стимуляции лимфопролиферации для белкового и липидного индукторов соответственно были ниже, чем в группах сравнения.

По данным Л.В. Сахно и соавт. [2004], к блоку пролиферации антиген-специфичных клонов клеток и последующей их гибели при ТЛ может приводить избыток антигена, например, дополнительная стимуляция Т-лимфоцитов PPD, который является компонентом *M. tuberculosis* (как и используемые нами белковый и липидный антигены), а также, по данным ряда других авторов [Мишин В.Ю. и соавт., 1996, 2004; Салина Т.Ю., Худзик Л.Б., 2001; Morris S.C. et al., 2009], токсическое действие МБТ с повреждением внутриклеточных структур, угнетением факторов синтеза АТФ, ДНК, аминокислот, цитокинов и др.

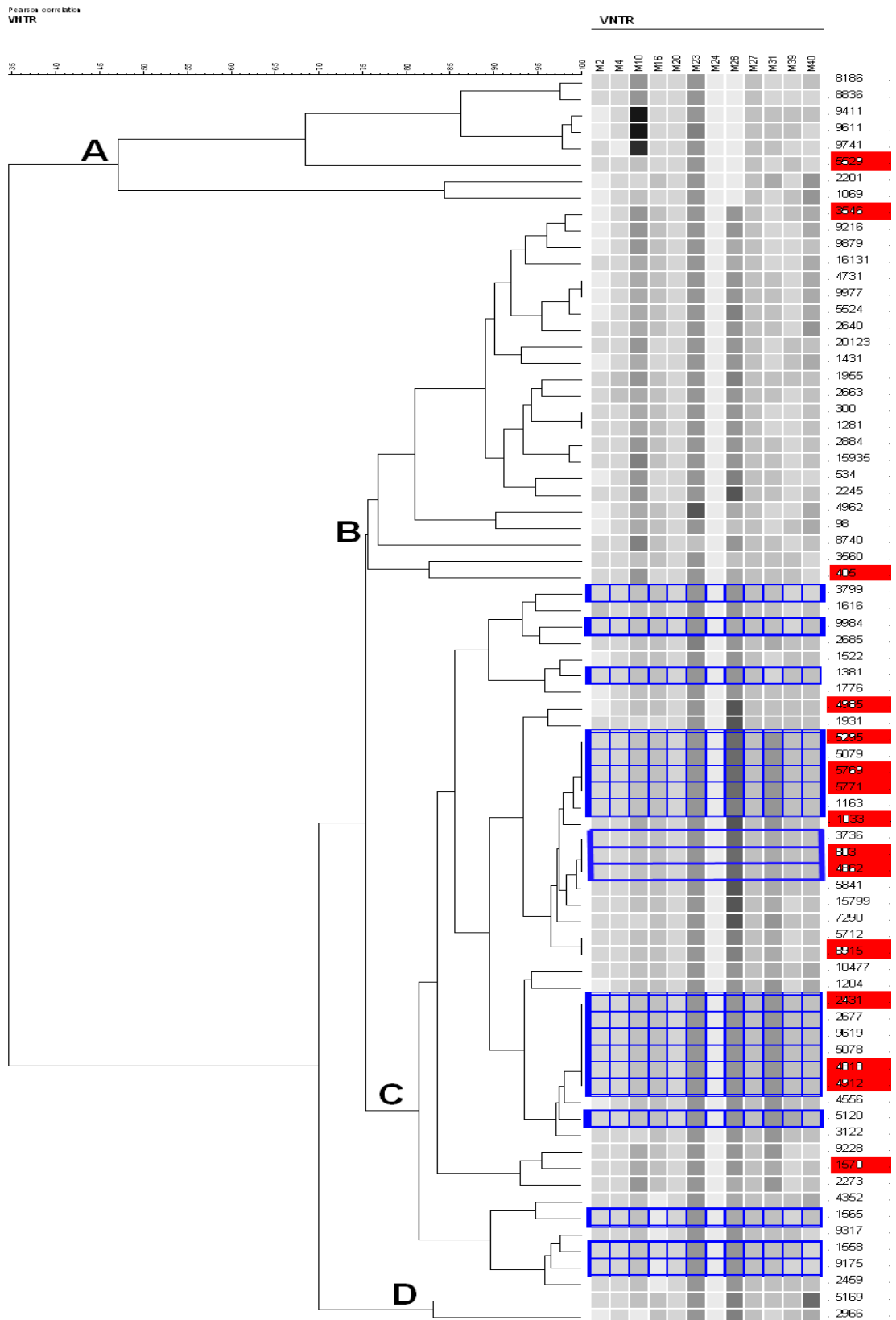


Рис. 1. Дендрограмма кластеризации *M. tuberculosis* (по результатам MIRU-VNTR-типирования 77 клинических изолятов). Синим цветом обозначены штаммы, относящиеся к Beijing-семейству, красным – штаммы с множественной лекарственной устойчивостью.

Так, у больных ТЛ в обеих обследованных нами группах отмечалось снижение (относительно контроля) базальной секреции IL-2 клетками крови, более выраженное у пациентов, выделяющих Beijing-штаммы МБТ. При этом у данной группы пациентов регистрировались высокие значения базальной выработки IL-12 и сопоставимый с нормой уровень продукции IFN γ , тогда как у больных, выделяющих «неBeijing»-штаммы МБТ, напротив, уровень продукции IL-12 оказался ниже нормы, а уровень IFN γ значимо превышал таковую. Добавление в культуры лимфоцитов периферической крови больных «Beijing-туберкулёзом» рекомбинантного IL-2 не приводило к усилению лимфопрлиферации относительно базального уровня (в отличие от аналогичного параметра у больных, инфицированных «неBeijing»-штаммами МБТ), что может служить косвенным доказательством дефицита рецепторов к IL-2 на клетках (рис. 2). Следствием недостаточной продукции IL-2 у больных, выделяющих МБТ пекинского семейства, вероятно, явился дефицит общих Т-лимфоцитов при нормальном количестве CD8⁺ клеток. Но, учитывая, что у больных «Beijing-туберкулёзом» было зарегистрировано повышение числа CD16⁺ лимфоцитов в крови и высокий уровень продукции IFN γ и IL-12, можно предположить, что клетки адекватно воспринимают активирующий стимул со стороны макрофагов. При «неBeijing-туберкулёзе» высокий уровень спонтанной секреции IFN γ мог обеспечиваться также за счет повышенного содержания CD8⁺ клеток в крови, на что указывает наличие положительной корреляции между этими показателями ($r=0,77$; $p<0,05$).

Известно, что при воспалении макрофаги могут быть двух видов: классически и альтернативно активированными. Первые характеризуются секрецией нитрооксида, провоспалительных цитокинов и генерируются в присутствии Th1-цитокинов, а альтернативно активированные, продуцирующие цитокины с противовоспалительной активностью, генерируются в присутствии цитокинов, синтезируемых Th2 (IL-4, IL-10). В процессе гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) происходит смещение баланса макрофагальных пулов в сторону классически активирующихся клеток, которые секретируют IL-12, обеспечивающий дифференцировку Th1-лимфоцитов, продуцирующих основной аутокринный ростовой фактор – IL-2. Т.к. у больных «Beijing-туберкулёзом» базальный уровень секреции IL-4 (как и у больных «неBeijing-туберкулёзом») оставался в пределах нормы, а уровень продукции IL-12 (в отличие от группы сравнения) был повышенным, можно предположить классический путь активации макрофагальных клеток, который однако не сопровождается активацией Th1-лимфоцитов. Но если в случае «Beijing-туберкулёза» причиной такой недостаточности является антиген-индуцированная анергия Т-лимфоцитов, то при «неBeijing-туберкулёзе» (как показали результаты исследования) – дефицит Т-активирующих цитокинов (рис. 2).

Анализ дендрограммы кластеризации, отражающей степень генетического родства штаммов *M. tuberculosis* по MIRU-VNTR-профилю, продемонстрировал неоднородность штаммов Beijing, а именно наличие уникальных и кластеризующихся МБТ. При этом необходимо отметить, что штаммы МБТ с уникальным VNTR-профилем чаще вызывали инфильтративный ЛЧТЛ, а штаммы, образующие кластеры – инфильтративный ЛУТЛ ($p<0,005$ по критерию Хи-квадрат). Для анализа зависимости изменений иммунного статуса при ТЛ от спектра лекарственной устойчивости *M. tubercu-*

losis, принадлежности МБТ к семейству Beijing и степени их генетического родства (способности кластеризоваться) были сформированы 2 группы больных: в первую вошли 8 пациентов, инфицированных уникальными штаммами МБТ пекинского семейства, вторую группу составили 13 пациентов, выделяющих кластеризующиеся (близкородственные) штаммы *M. tuberculosis* семейства Beijing.

Исследование количественного состава белой крови выявило однонаправленные изменения (по сравнению с нормой) ОКЛ (повышение), уровня лимфоцитов (снижение) и их отдельных фракций (снижение числа CD3-, CD4-, CD45RA-позитивных клеток) в периферической крови у больных обеих обследуемых групп. Однако более значимое снижение числа CD3⁺ клеток (абсолютного и относительного) и CD4⁺ лимфоцитов на 70%, 37% и 41%, 50% соответственно по сравнению с нормой оказалось в группе больных, инфицированных *M. tuberculosis* с уникальным VNTR-профилем. Также у этой группы больных было зарегистрировано повышение абсолютного числа CD16⁺ лимфоцитов.

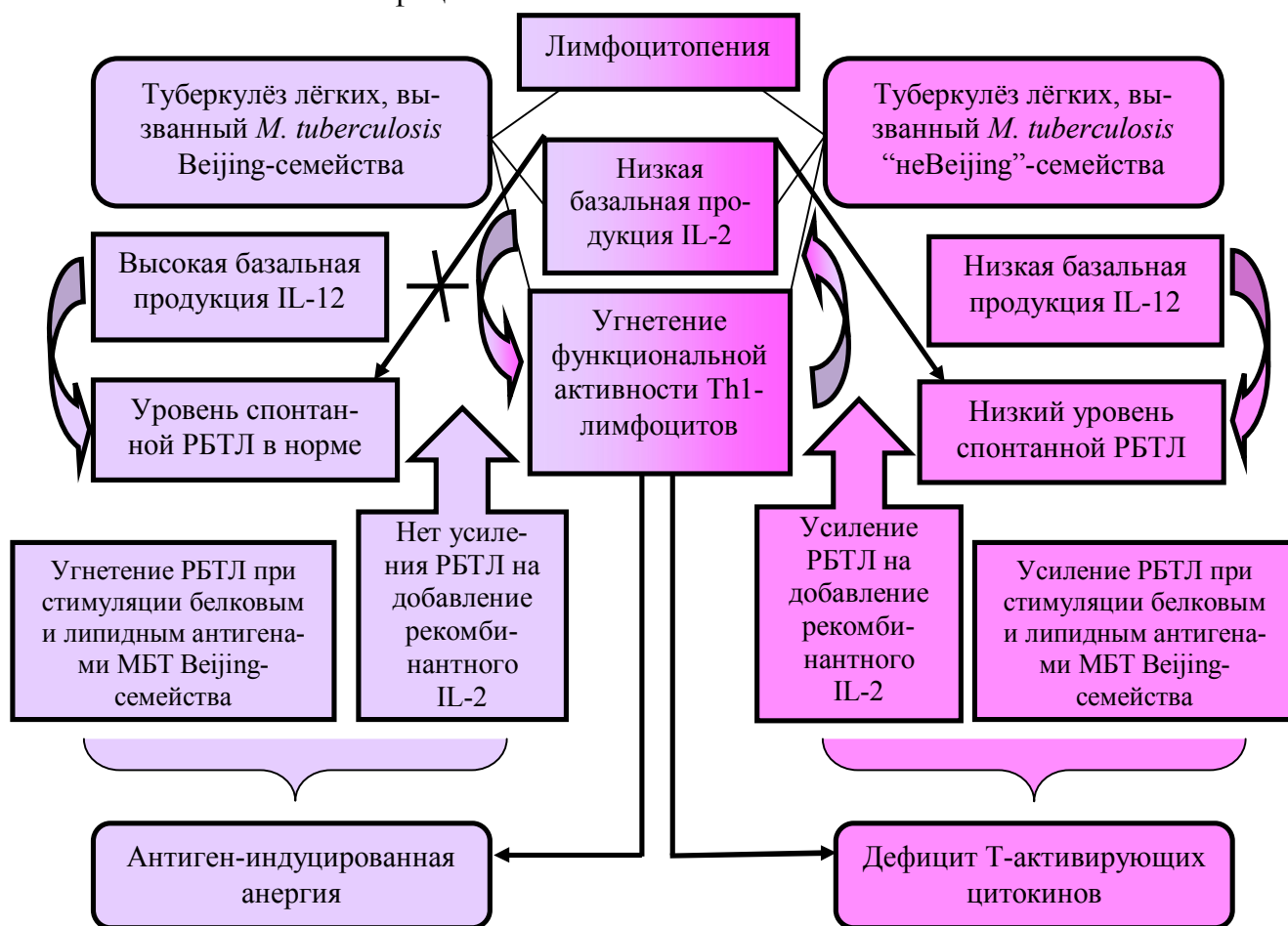


Рис. 2. Факторы иммунопатологических изменений при туберкулезе легких в зависимости от генотипической принадлежности инфицирующего штамма *M. tuberculosis* (по результатам собственных исследований) (МБТ – микобактерия туберкулеза; РБТЛ – реакция бластной трансформации лимфоцитов).

Кроме этого, у пациентов, выделяющих кластеризующиеся штаммы МБТ, отмечено повышение спонтанной лимфопролиферативной активности относительно аналогичного параметра в группе сравнения, что, вероятно, было связано с более вы-

соким количеством CD3⁺ клеток. Проведенные исследования выявили значимо более низкие индексы стимуляции бластообразования для белкового и липидного микобактериальных антигенов при «Beijing-туберкулёзе» по сравнению с таковыми у больных, инфицированных кластеризующимися штаммами МБТ, что может свидетельствовать об истощении функциональных свойств лимфоцитарных клеток.

Анализ цитокинпродуцирующей активности мононуклеаров периферической в зависимости от степени генетического родства МБТ позволил выявить однонаправленные изменения спонтанной секреции IL-2, IL-4 (снижение) и IFN γ (увеличение) относительно контрольных значений у больных ТЛ, инфицированных МБТ Beijing-семейства. По-видимому, высокий базальный уровень продукции IFN γ за счет CD16⁺ клеток (на что указывалось выше) характерен преимущественно для «Beijing-туберкулёза», вызванного уникальными (не кластеризующимися) штаммами возбудителя, т.к. абсолютное число натуральных киллеров у данной группы больных оказалось более высоким. Кроме того, резервная способность синтезировать IFN γ мононуклеарами периферической крови у больных ТЛ, выделяющих МБТ с уникальным VNTR-профилем, также оказалась более высокой, чем в группе пациентов, инфицированных близкородственными штаммами возбудителя. Установлено, что некоторые гены МБТ (например, pks15/1) участвуют в синтезе микобактериальных фенольных гликолипидов. ФГЛ МБТ, по данным литературы, считаются важными факторами вирулентности, их действие связано с угнетением Th1-опосредованного иммунного ответа хозяина [Reed M.V. et al., 2004; Лихошвай Е.Ю. и соавт., 2006]. Идентификация полноценных генов pks15/1 позволяет выявить штаммы с потенциально высокой вирулентностью, в том числе представителей филогенетической линии Beijing [Вороница Е.Ю. и соавт., 2004]. Возможно, эпидемиологически значимые штаммы МБТ – кластеризующиеся изоляты генотипа Beijing, имеют преимущества в распространении в популяции и в виду некоторых биологических особенностей в большей степени влияют на активность иммунной системы, угнетая не только специфические реакции антимикобактериальной защиты, но и функции макрофагов. Подтверждением данному предположению может являться факт глубокого угнетения резерва IL-12-продуцирующей активности мононуклеаров у больных, инфицированных кластеризующимися штаммами Beijing-МБТ. Установлено, что большинство белков МБТ (PE (пролин-глутамин) и PPE (пролин-пролин-глутамин)) локализовано на внешней поверхности микробной клетки и, вероятнее всего обеспечивают антигенную вариативность, что соответствующим образом влияет на развитие иммунного ответа, в частности, путём ингибирования антигенпредставляющей и цитокинсекретирующей функции макрофагов [Banu S. et al., 2002; Бибикова М.В. и соавт., 2006].

Как показывают результаты проведенного исследования, биологические свойства возбудителя в значительной степени сказываются на особенностях реагирования иммунокомпетентных клеток крови в процессе туберкулёзного воспаления, модулируя характер специфического иммунного ответа. Следовательно, изучение антигенных свойств микобактерий различных генетических семейств, а также механизмов формирования иммунологических нарушений при туберкулезной инфекции, детерминирующих характер клинического течения и исходы заболевания, представляется весьма актуальным и своевременным.

ВЫВОДЫ

1. Среди генетически неоднородных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Томска и Томской области, 19% проявляют множественную лекарственную устойчивость. Штаммы семейства Beijing составляют 27% от общей популяции возбудителя, имеют высокий показатель кластеризации (74%), уровень их множественной лекарственной устойчивости в 3 раза превышает таковой у «непекинских» штаммов, для которых доля кластеризующихся штаммов составляет 11%.
2. В основе дисбаланса клеточного звена иммунитета при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких лежит снижение числа CD3⁺, CD4⁺, CD45RA⁺ клеток и угнетение лимфопрлиферативной активности вследствие гипосекреции Т-активирующих цитокинов (IL-2 и IL-12) на фоне повышения количества CD16⁺ лимфоцитов и продукции IFN γ .
3. При лекарственно-резистентном туберкулезе лёгких выраженность нарушений функциональной активности лимфоцитов крови зависит от спектра лекарственной устойчивости инфицирующего штамма *Mycobacterium tuberculosis*. При туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя степень угнетения пролиферативной активности лимфоцитов и снижения резерва продукции IL-2 выше, чем у больных с лекарственной полирезистентностью и монорезистентным туберкулезом лёгких, характеризующимся высоким уровнем базальной и БЦЖ-индуцированной секреции IL-12.
4. *Mycobacterium tuberculosis* пекинского семейства в 10% случаев вызывают диссеминированный туберкулез лёгких и в 90% случаев – инфильтративный туберкулез лёгких, лекарственно-чувствительный вариант которого ассоциирован с уникальным, а лекарственно-устойчивый – с кластеризующимся VNTR-профилем возбудителя. При этом при Beijing-туберкулезе лейкоцитоз, угнетение лимфопрлиферации на фоне гипопродукции IL-2 и гиперпродукции IL-12 носят более выраженный характер, чем при «неBeijing»-инфекции.
5. У больных, инфицированных Beijing-штаммами *Mycobacterium tuberculosis* с уникальным VNTR-профилем, дефицит CD3⁺, CD4⁺ лимфоцитов, повышение количества CD16⁺ клеток и IFN γ -продуцирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови более значительны, чем при туберкулезе лёгких, вызванном кластеризующимися микобактериальными Beijing-штаммами (со 100%-й степенью гомологии VNTR-профилей), которому свойственно увеличение наработки IL-12.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Микровязкость и липидный спектр мембраны мононуклеарных лейкоцитов крови у больных туберкулезом лёгких [Текст] / Есимова И.Е., Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р. // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – №8. – С. 15-18.
2. Особенности поверхностной архитектоники лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом лёгких [Текст] / Новицкий В.В., Стрелис А.К., Уразова О.И., Воронкова О.В., Михаленко А.Н., Шевцова Н.М., Сеницына В.А., Хасанова Р.Р., Пирогова Н.П., Рыбакова М.А. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. - №10. – С. 3-6.

3. Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса при лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулёзе лёгких [Текст] / Уразова О.И., Воронкова О.В., Стрелис А.К., Серебрякова В.А., Хасанова Р.Р., Земляная Н.А. // Туберкулёз в России, год 2007: материалы VIII Российского съезда фтизиатров. – М., 2007. – С. 114.
4. Генотипический профиль лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. циркулирующих на территории Томской области [Текст] / Новицкий В.В., Хасанова Р.Р., Наследникова И.О., Стрелис А.К., Уразова О.И., Воронкова О.В. // Туберкулёз в России, год 2007: материалы VIII Российского съезда фтизиатров. – М., 2007. – С. 119.
5. Features of production TNF- α & IL-2 at tuberculosis of lung of chemotherapy [Text] / Hasanova R.R., Urazova O.I., Voronkova O.V., Vasil'eva O.A., Kolosova A.E., Istanbul Y.V. // Commemorating 15 years of Russia-Japan Medical Exchange under the guidance of Japan-Russia. Medical Exchange Foundation (1992-2007): book of abstract. – Blagoveshensk, 2007. – P. 58-59.
6. Influence of antituberculosis drugs on functional activity of lymphocytes [Text] / Vasil'eva O.A., Urazova O.I., Voronkova O.V., Hasanova R.R., Melnik M.I. // Commemorating 15 years of Russia-Japan Medical Exchange under the guidance of Japan-Russia. Medical Exchange Foundation (1992-2007): book of abstract. – Blagoveshensk, 2007. – С. 107.
7. Оценка цитотоксической активности этамбутола с использованием МТТ-теста [Текст] / Васильева О.А., Уразова О.И., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р., Мельник М.И., Стамбула Ю.В., Колосова А.Е. // Актуальные вопросы патофизиологии: межгородская конференция молодых учёных. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 24-25.
8. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у больных туберкулёзом лёгких [Текст] / Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Воронкова О.В., Васильева О.А., Стамбула Ю.В., Мельник М.И. // Актуальные вопросы патофизиологии: межгородская конференция молодых учёных. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 131-133.
9. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у больных туберкулёзом лёгких [Текст] / Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Воронкова О.В., Васильева О.А., Колосова А.Е., Стамбула Ю.В., Мельник М.И. // Медицинская иммунология. – 2007. – Т.9, №2/3. – С. 252.
10. Особенности иммунотоксического действия противотуберкулёзных химиопрепаратов [Текст] / Васильева О.А., Уразова О.И., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р. // Медицинская иммунология. – 2007. – Т.9, №2/3. – С. 217-218.
11. Реактивность лимфоцитов периферической крови при туберкулёзе лёгких [Текст] / Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Воронкова О.В., Стамбула Ю.В., Колосова А.Е. // Туберкулёз, СПИД, вирусные гепатиты, проблемы безопасности крови и менеджмент в здравоохранении: тезисы Российско-германской конференции Форума Коха-Мечникова. – Томск, 2007. – С. 86.
12. Влияние противотуберкулёзных химиопрепаратов на продукцию ИЛ-12 лимфоцитами периферической крови [Текст] / Васильева О.А., Уразова О.И., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р., Земляная Н.А., Колоколова О.В., Филинюк О.В. // Туберкулёз, СПИД, вирусные гепатиты, проблемы безопасности крови и менеджмент в здраво-

- охранении: тезисы Российско-германской конференции Форума Коха-Мечникова. – Томск, 2007. – С. 68.
13. Дизрегуляция иммунитета при туберкулёзе лёгких [Текст] / Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Серебрякова В.А., Хасанова Р.Р., Васильева О.А., Филинчук О.В., Земляная Н.А., Колоколова О.В., Наследникова И.О. // Туберкулёз, СПИД, вирусные гепатиты, проблемы безопасности крови и менеджмент в здравоохранении: тезисы Российско-германской конференции Форума Коха-Мечникова. – Томск, 2007. – С. 82.
14. Типовые реакции фагоцитов крови при туберкулёзе лёгких [Текст] / Филинчук О.В., Земляная Н.А., Уразова О.И., Стрелис А.К., Воронкова О.В., Буйнова Л.Н., Васильева О.А., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А. // Туберкулёз, СПИД, вирусные гепатиты, проблемы безопасности крови и менеджмент в здравоохранении: тезисы Российско-германской конференции Форума Коха-Мечникова. – Томск, 2007. – С. 84.
15. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при туберкулёзе лёгких [Текст] / Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Воронкова О.В., Васильева О.А., Стамбула Ю.В., Колосова А.Е. // Науки о человеке: материалы VIII международного молодёжного конгресса молодых учёных и специалистов. – Томск, 2007. – С. 61-62.
16. Влияние противотуберкулёзных химиопрепаратов на дегидрогеназную активность лимфоцитов периферической крови [Текст] / Васильева О.А., Уразова О.И., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р., Мельник М.И., Стамбула Ю.В., Колосова А.Е. // Науки о человеке: материалы VIII международного молодёжного конгресса молодых учёных и специалистов. – Томск, 2007. – С. 173-174.
17. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов у больных туберкулёзом лёгких [Текст] / Хасанова Р.Р., Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К., Колосова А.Е., Стамбула Ю.В., Серебрякова В.А., Наследникова И.О., Колоколова О.В., Васильева О.А., Будкина Т.Е. // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2008. – №3. – С. 31-35.
18. Оценка влияния противотуберкулёзных препаратов на цитохимический статус лимфоцитов *in vitro* [Текст] / Васильева О.А., Уразова О.И., Серебрякова В.А., Новицкий В.В., Стрелис А.К., Шевцова Н.М., Воронкова О.В., Мельник М.И., Хасанова Р.Р. // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2008. – №3. – С. 27-30.
19. Сравнительная оценка показателей адаптивного иммунитета при лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулёзе лёгких [Текст] / Воронкова О.В., Уразова О.И., Хасанова Р.Р., Новицкий В.В., Серебрякова В.А., Наследникова И.О., Колосова А.Е., Будкина Т.Е., Никулина Е.Л., Васильева О.А., Пирогова Н.П. // Аллергология и иммунология. – 2007. – Т.9, №3. – С. 288-289.
20. Иммунопатогенез бактериальных и вирусных инфекций: роль полиморфизма генов цитокинов [Текст] / Наследникова И.О., Уразова О.И., Воронкова О.В., Новицкий В.В., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А., Будкина Т.Е., Васильева О.А., Никулина Е.Л., Сухоленцева Н.А., Колосова А.Е., Федорович Т.В., Чернова Е.Н. // Аллергология и иммунология. – 2007. – Т.9, №3. – С. 294.

21. Генетическая гетерогенность возбудителей вирусного гепатита и туберкулёза лёгких на территории Томской области [Текст] / Воронкова О.В., Наследникова И.О., Уразова О.И., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А., Никулина Е.Л., Юрьева Е.А. // Науки о человеке: материалы IX международного молодёжного конгресса молодых учёных и специалистов. – Томск, 2008. – С. 56-57.
22. Зависимость продукции ИЛ-2 от варианта туберкулёза лёгких (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый) [Текст] / Воронкова О.В., Наследникова И.О., Уразова О.И., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А., Стамбула Ю.В., Колосова А.Е., Федорович Т.В., Скороходова М.Г., Чернова Е.Н. // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т.2, №2-3. – С. 245.
23. Роль аллельного полиморфизма генов цитокинов в иммунопатогенезе бактериальных и вирусных инфекций [Текст] / Наследникова И.О., Воронкова О.В., Уразова О.И., Колоколова О.В., Стамбула Ю.В., Рубанова А.И., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А., Федорович Т.В., Чернова Е.Н., Скороходова М.Г. // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т.2, №2-3. – С. 256.
24. Характеристика гуморального иммунного ответа у больных туберкулёзом лёгких до и в динамике противотуберкулёзной химиотерапии [Текст] / Воронкова О.В., Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К., Хасанова Р.Р., Серебрякова В.А., Филинчук О.В., Земляная Н.А., Перевозчикова Т.В., Наследникова И.О., Колоколова О.В., Пирогова Н.П. // Иммунология. – 2008. – Т.29, №5. – С. 281-283.
25. Циркуляция на территории Томской области *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing [Текст] / Татьков С.И., Воронкова О.В., Уразова О.И., Сивков А.Ю., Хасанова Р.Р., Новицкий В.В., Стрелис А.К., Мишустин С.П., Павлова В.Е., Наследникова И.О., Никулина Е.Л. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2008. – №4. – С. 13-17.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЛУ – лекарственная устойчивость

ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулёз лёгких

ЛЧ – лекарственная чувствительность

ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулёз лёгких

МБТ – микобактерия туберкулёза

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ПТП – противотуберкулёзный препарат

ТЛ – туберкулёз лёгких

ФГЛ – фенольные гликолипиды

CD (cluster definition) – антигены кластеров дифференцировки клеток

IL – интерлейкин

IFN – интерферон

MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units) – микобактериальные рассеянные повторяющиеся повторы

Th – Т-хелпер

VNTR (variable number tandem repeat) – различное количество tandemных повторов

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой фтизиатрии и пульмонологии ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д-ру мед. наук, профессору, чл.-корр. РАМН А.К. Стрелису, заведующему ЦНИЛ ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д-ру мед. наук, профессору А.Н. Байкову, заведующей лабораторией молекулярной медицины д-ру мед. наук Литвиновой Л.С., главному врачу ОГУЗ «Томская областная клиническая туберкулезная больница», канд. мед. наук Г.В. Яновой, главному врачу ОГУЗ «Томский областной противотуберкулезный диспансер» С.П. Мишустину, заведующей бактериологической лабораторией ОГУЗ «Томский областной противотуберкулезный диспансер» В.Е. Павловой, заведующему лабораторией разработки новых методов диагностики заболеваний человека отдела иммунотерапевтических препаратов ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора д-ру биол. наук С.И. Татькову за проявленный интерес к работе, ценные теоретические и методические рекомендации.